Tome 72, fascicule 1 (à la mémoire d'Emile Guyénot), nº 8. — Avril 1965

Différenciation du muscle embryonnaire du cœur de la Truite Etude au contraste de phase[1]

par

M. PERRET et H. HUGGEL

Laboratoire d'anatomie et physiologie comparées, Université de Genève

Avec 3 planches

INTRODUCTION

L'étude du développement du tube cardiaque de l'embryon de truite, déjà entreprise par Huggel (1961 + 1963) a incité notre laboratoire à reprendre certaines faces de ce problème. Connaître en détail l'histologie de ce muscle en formation, et de ce cœur à cavités impaires nous a paru particulièrement intéressant. Cet organe reste, au cours de sa genèse, un matériel de choix pour une observation microscopique en contraste de phase, sur tissu vivant.

Nous avons donc suivi, *in vivo*, la morphogenèse et l'histogenèse du cœur de truite *(Salmo gairdneri irideus* et *Salmo fario)* dès l'apparition d'une ébauche rectiligne de diamètre uniforme, sur des embryons âgés de 25 somites, jusqu'à la formation d'un cœur à cavités successives séparées, au stade des jeunes alevins.

Nous évitons les artéfacts inhérents à tout traitement en banissant fixateurs et colorants. Toutefois, après dix à vingt minutes, des altérations apparaissent, dues à l'assèchement de la préparation. Les phases successives de ces changements de structure

[1] A la mémoire du professeur E. Guyénot.
Article publié avec l'appui d'un subside du Fonds national suisse.

ont été contrôlées et ont permis d'éliminer de nos observations les pseudostructures.

TECHNIQUE

L'embryon étant dégagé, le cœur est isolé, détaché à l'aide de pinces et de scalpels fins, puis étalé entre lame et lamelle. Ces différentes opérations se passent en une solution de Ringer adaptée par Huggel (1959) en vue de l'étude de l'œuf de la truite. L'adjonction de sérum de truite adulte (1 goutte par ml) prolonge la durée de l'activité des cœurs.

La différenciation du cœur de l'embryon de truite comprend son développement morphologique et la création du tissu musculaire (Swarup 1958, v. Skramlik 1935).

Nous avons observé les phases de ce développement à partir du vaisseau rectiligne, dans le plan sagittal de l'embryon jusqu'au cœur de l'alevin avec sa courbure, puis sa torsion entre le ventricule et l'atrium.

La différenciation histologique peut se décomposer en trois phases. Du tissu embryonnaire, nous passons à un tissu contractile, mais de type épithélial dans lequel apparaissent peu à peu des myoblastes.

Description par stades

I. *De 24 à 30 somites*

Forme du cœur :

C'est un simple renflement de la région branchiale qui s'étire en un tube cylindrique.

Description du tissu :

La densité du blastème rend l'analyse au contraste de phase encore malaisée. La vue tangentielle révèle des cellules ovoïdes. Le tissu central se présente moins dense et à caractère lacunaire. Les noyaux arrondis (13 μ sur 1 (11) μ) [1] possèdent deux gros nucléoles et sont excentrés à l'intérieur du corps cellulaire. Le cytoplasme est bourré de granulations grossières (1 à 4 μ). Partout, des goutte-

[1] Les mesures micrométriques faites *in vivo* sont toutes relatives et dépendent de l'état de contraction d'une part, et de la quantité de solution contenue dans la préparation, d'autre part. Elles peuvent varier du simple au double.

lettes de vitellus forment des taches très réfringentes; c'est un tissu uniforme de type embryonnaire.

II. *De 30 à 38 somites*

Forme du cœur:

L'ébauche cylindrique des premiers stades s'allonge au maximum dans l'espace du sac péricardique entre l'embryon et le vitellus. Du côté veineux, sa base s'élargit en forme de cône, d'où un lumen central gagnera peu à peu la partie opposée du cœur. Au stade de 38 somites, cette cavité interne a parcouru les deux tiers du tube; de plus, le cœur se recourbe en son milieu.

Les cœurs embryonnaires se contractent dès ce moment.

Description du tissu:

Avec l'entrée en fonction du cœur, les différenciations cellulaires deviennent importantes. Le blastème s'organise en deux tissus fondamentaux, soit: l'épimyocarde et l'endothélium délimitant le lumen cardiaque en formation.

Ce dernier tissu est si ténu que des observations *in vivo* et *in situ* nous renseignent fort peu; seuls des fragments tissulaires obtenus par écrasement nous indiquent sa présence. Dès 31 somites, le tissu épithélial superficiel a pris sa forme quasi définitive. Les cellules en sont régulièrement ordonnées, étroitement juxtaposées, et ont dans leurs dimensions extrêmes, 35 μ sur 25 μ; les noyaux restent sphériques. Nous sommes en présence d'un épithélium de type pavimenteux. Plus profondément, les cellules s'étirent; leurs noyaux sont alors excentrés et occupent le tiers de la base triangulaire et bombée, alors que le sommet s'allonge en un long prolongement. Dans ce cytoplasme abondent des granules, soit accolées deux par deux, soit, et surtout dans les stades plus âgés, isolées, mais ayant doublé leurs dimensions, jusqu'à 2 μ à 38 somites. Des recherches sont en cours pour en déterminer leur caractère: s'agit-il de mitochondries en voie de différenciation ?

III. *De 40 à 54 somites*

Forme du cœur:

La courbure du cœur s'accentue et forme un angle de 60° qui le partage en deux régions. Puis ce processus s'étend dans un

espace à trois dimensions, et le cœur subit une torsion qui lui confère une forme en S. Ce mouvement continue jusqu'à des stades ultérieurs (58 somites). La future cavité ventriculaire présente déjà un épaississement considérable de ses parois.

Description du tissu cardiaque:

L'épithélium superficiel reste le siège d'une activité intense, de nombreuses mitoses en sont la preuve. Des cellules ovoïdes rompent l'uniformité des cellules pavimenteuses de cette couche. Elles revêtent une importance particulière, car elles envoient des prolongements cytoplasmiques vers la couche intermédiaire plus profonde.

In vivo, nous constatons que ces prolongements exercent une tension sur le corps cellulaire en le tirant en profondeur; il en résulte ainsi une surface épithéliale discontinue avec des fosses.

Ces cellules ovoïdes sont plus grandes que celles qui les entourent et contiennent des vacuoles péri-nucléaires typiques. L'épithélium pavimenteux, au contraire, n'en contient guère. La couche intermédiaire est de plus en plus composée de ces cellules à longs prolongements, et dès lors, nous pouvons parler de myoblastes. Aux larges plages cytoplasmiques des stades précédents ont succédé des allongements fibreux de 40 μ et plus, formant de longues cellules de 80 μ environ.

IV. *55 somites et œufs embryonnés*

Les œufs sont dits embryonnés lorsque l'alevin est bien visible et que ses yeux sont pigmentés (70 myotomes environ).

Forme du cœur:

La torsion du cœur se poursuit et il se divise en deux cavités délimitées par des rétrécissements. Chacune de ces régions a son propre développement musculaire. Entre 65 et 70 myotomes, il atteint sa morphologie définitive de cœur impair.

Description du tissu:

Là aussi, il y a recrudescence de mitoses dans les couches profondes.

La quantité de myoblastes à prolongements cytoplasmiques devient plus élevée que celle des cellules épithéliales. Ces cellules

se groupent dans un réticule lâche qui enserre des vides : cette image est la préfiguration des travées et de leurs trames spongieuses. La longueur de ces éléments allongés dépasse 60 μ. L'aspect des inclusions cytoplasmiques change. Des granulations se disposent en collier dans l'axe des prolongements protoplasmiques les plus étroits.

Ces éléments granulaires sont séparés les uns des autres par des éléments clairs. Leur arrangement à l'emplacement futur de la striation transversale fait apparaître un état de préstriation. Les membranes cellulaires entre les travées juxtaposées sont souvent bien visibles.

A 60 somites, nous trouvons de véritables fibres musculaires, striées ; très rares et fort éparses au début, leur nombre s'accroît avec l'ontogenèse.

Des éléments fibrillaires à stries transversales sont dispersées dans le myoblaste. Ces fibrilles sont très étroites et contiennent un nombre limité de disques. Une même cellule peut en contenir plusieurs, disséminées dans le cytoplasme. Le contraste de phase ne nous permet pas de déceler des liaisons éventuelles entre elles. Les deux disques montrent l'image de bandes A et I, mais la preuve de leur anisotropie n'est pas faite. A ce stade de formation des stries, le noyau reste central. La couche épithéliale est distendue par l'épaisseur de la musculature, elle apparaît donc très mince et garde sa forme cellulaire polygonale (30 μ sur 20 μ dans leurs dimensions extrêmes), avec des membranes bien distinctes. Particulièrement autour du noyau de longues chaînes, de très fines granulations sont serrées les unes contre les autres ; leurs diamètres sont à la limite de la visibilité du microscope optique.

V. *Temps de l'éclosion — Alevin*

Forme du cœur :

Les différentes cavités du cœur sont telles qu'elles subsisteront au cours de la vie adulte. Nous dénombrons d'arrière en avant, le sinus veineux, l'atrium, le ventricule et le bulbe artériel.

Le sinus est une poche allongée à parois minces, peu musculaire. Les fibres qui le composent courent parallèlement au grand axe de cette cavité. L'atrium qui fait suite est fortement extensible. Cet organe est soutenu par des fibres musculaires en corbeille entre

les mailles desquelles s'intercalent tous les autres éléments tissulaires tels que muscles pectinés selon Grassé. Quant au ventricule, sa paroi musculaire est épaisse.

Description du tissu :

Le développement musculaire et la différenciation tissulaire atteignent peu à peu leur point culminant. Cette fois, ce sont de véritables fibres striées, de largeur variable (parfois plus de 20 μ). Chaque fibre est formée de 2 à plus de 12 myofibrilles qui se ramifient entre elles. Il est pratiquement impossible d'en déterminer la longueur puisqu'elles se continuent à travers les membranes cellulaires. Les bandes A et I se succèdent régulièrement et leurs mesures varient avec l'état de contraction, dû d'ailleurs surtout à la bande A. C'est l'image classique d'une fibre striée avec disques Z et disques intercalaires qui traversent plusieurs fibrilles sans être interrompus par la structure fibrillaire (Huxley et Hanson 1955 et 1960; Walls 1960).

Parfois aussi, nous observons une striation longitudinale grossière (Harari 1963). Malheureusement cette image, assez rare, n'est apparente que dans des conditions spéciales encore mal définies. Les noyaux en paquets de deux à trois sont maintenant repoussés à la périphérie de la fibre. Telle est la structure finale du protoplasme contractile. A ces stades, nous pouvons différencier nettement entre ce protoplasme contractile (myofibrille) et le sarcoplasme. Ce dernier est rare; il entoure surtout les noyaux, se remarque à la périphérie des fibres, il est de consistance grenue.

DISCUSSION ET RÉSUMÉ DES RÉSULTATS

Le cœur embryonnaire de la truite est animé de contractions automatiques pendant une longue phase de son développement, sans que le microscope au contraste de phase ne révèle des éléments striés fibrillaires. Les inclusions cytoplasmiques changent de forme et de structure pendant cette première phase. Dès 60 somites, des éléments fibrillaires striés apparaissent à l'intérieur de quelques myoblastes. Cette image de poussée fibrillaire, précédée d'une phase d'intense activité mitotique rappelle beaucoup la régénération musculaire décrite par Speidel (1939). Cette striation repré-

sente nettement un stade préliminaire *sans bandes Z ou H*, les disques clairs et sombres étant mal délimités. Ces myoblastes semblent se différencier à partir d'un tissu homogène de type épithélial. Cet épithélium livre des myoblastes qui se prolongent en profondeur et provoquent par leurs contractions individuelles un mouvement de l'épithélium et de l'endothélium. L'origine des contractions n'est donc pas due à l'un ou à l'autre de ces épithéliums.

Pendant cette différenciation du myoblaste en cellule musculaire fibrillaire, des granulations sont disposées en collier le long des prolongements cytoplasmiques, futur porteur de fibrilles. Parfois cette disposition fait songer à une préstriation. Ces granulations sont en grande partie constituées de mitochondries. Dès lors, les myofibrilles définitives se forment et leur nombre s'accroît avec l'âge de l'embryon. La formation des myofibrilles adultes ne semble plus parcourir le stade embryonnaire primaire de préstriation intracellulaire. Les myofibrilles se forment de cellule en cellule et créent de ce fait immédiatement un tissu homogène. Ce mode de croissance s'approche beaucoup de celui constaté en culture de tissu ou dans la régénération musculaire. Une autre explication de cette différenciation primaire a dû être abandonnée; elle se basait sur quelques rares images où nous observions des fibrilles (conjonctif futur ?) transversales.

La différenciation tissulaire comprend encore le déplacement des noyaux, la distribution du cytoplasme, le diamètre des fibres, leur composition et la transformation des mitochondries embryonnaires en sarcosomes.

RÉSUMÉ

Le cœur embryonnaire des téléostéens se différencie à partir d'un blastème uniforme. Les myoblastes contractiles ne montrent au contraste de phase aucune structure fibrillaire jusqu'au stade de 60 somites. Les premières myofibrilles apparaissent courtes, dispersées, rares et intracellulaires sans contact entre les cellules. La formation des myofibrilles est accompagnée d'un changement morphologique des inclusions intracellulaires. Le tissu définitif de l'atrium est constitué de longues fibres du type « muscle pectiné », et le ventricule contient encore longtemps des plages en état de différenciation du type embryonnaire.

ZUSAMMENFASSUNG

Das embryonale Herz der Teleostier *(Salmo gairdneri irideus)* differenziert sich aus einem uniformen Blastem. Bis zum Stadium 60 Somiten zeigt sich keine fibrilläre Struktur in den kontraktilen lebenden Myoblasten mittels Phasen kontrast-Beobachtung. Die ersten myofibrillären Strukturen sind intrazellulär, kurz, im Cytoplasma zerstreut und ohne Kontakt mit den Nachbarzellen. Die Synthese der definitiven Myofibrillen ist von fundamentalen Veränderungen der Zellpartikel begleitet. Das Atrium wird von langen Fasern gebildet, die in fingerförmiger Anordnung angelegt sind (« muscle pectiné ») und der Ventrikel enthält noch lange Zeit Orte embryonaler Differenzierung (« plages embryonnaires »).

SUMMARY

The differentiation of the embryonic heart tube beginns with a uniform epithelium. The contractile myoblasts do not show any fibrillar structure *in vivo*. During the stage of 60 somites the first myofibrils appear; they are intracellular, short and disseminated and without any contact with the neighbouring cells. The formation of myofibrils is accompanied by a change in the intracellular inclusions. The adult tissue of the atrium is composed of long fibres, « pectinate muscle ». During a long post-embryonic period, the ventricle contains some small areas of embryonic fibers between a differenciated adult muscle tissue.

BIBLIOGRAPHIE

Bourne, G. H. 1960. *Structure and function of muscle.* Academic Press N. Y.

Grasse, P. *Traité de Zoologie*, t. XII, fasc. 2.

Hanson, J., Huxley, H. E. 1955. *The structural basis of contraction in striated muscle.* Symposia Soc. exp. biol. IX: 229-265.

Harary, I., Farley, B. 1963. *In vitro studies on single beating Rat heart cells.* Exp. cell. Res. 29: 451-465, 466-470.

Hibbs, R. G. 1956. *Electron Microscopy of developing cardiac muscle iu chick embryos.* Amer. J. Anat., 99.

Huggel, H. 1952. *Temperaturabhängigkeit und Herzfrequenz des embryonalen Herzschlauchs bei der Forelle.* Rev. suisse Zool. 59: 242-247.

— 1959. *Experimentelle Untersuchungen über die Automatie, Temperaturabhängigkeit und Arbeit des embryonalen Fischherzens unter besonderer Berücksichtigung der Salmoniden und Scyliorhiniden.* Z. vgl. Physiol. 42: 63-102.

— 1961. *Zur Morphologie der Herzbildung bei den Salmoniden und Scyliorhiniden.* Rev. suisse Zool. 68: 111-119.

— 1963. *Quelques aspects de l'anatomie et physiologie du cœur.* Bastions, n° 10, Genève.

Huxley, H. E., Hanson, J. 1960. Voir Bourne 1960.

Patten, B. M., Cramer, T. C. 1933. *The initiation of contraction in the embryonic chick heart.* Amer. J. Anat. 53: 349.

von Skramlik, E. 1935. *Ueber den Kreislauf bei den Fischen.* Ergeb. Biol. XI: 1-130.

Speidel, C. C. 1939. *Studies of living muscles: II. Histological changes in single fibres of striated muscle during contraction and clotting.* Amer. J. Anat. 65: 471-530.

Swarup, H. 1958. *Stages in the Development of the Stickleback Gasterosteus aculeatus (L.).* J. Embryol. exp. Morph. 6: part 3, 373-383.

Walls, E. W. 1960. Voir Bourne, 1960.

PLANCHE I

1: Ebauche d'un tube cardiaque à 24 somites. Tissu uniforme de type embryonnaire.

2: Myoblaste à prolongements cytoplasmiques à 45 somites.

3: Myofibrilles courtes, intracellulaires avec quelques stries transversales (œuf embryonné). Disques sombre et clair peu délimités.

4: Myofibrilles continues en voie de formation. Striation transversale complète et nette (œuf embryonné).

5: Myoblaste riche en granulations intracellulaires et périnucléaires, quelques myofibrilles éparses en formation. Noyau encore central (œuf embryonné).

6: Ebauche du réticulum, myofibrilles continues.

PLANCHE II

7: Oreillette à l'éclosion. Disques intercalaires formés et traversant les myofibrilles au niveau de la bande Z.

8: Vue générale de l'oreillette à l'éclosion montrant l'épithélium extérieur et l'arrangement des fibres en corbeille.

9: Fibre musculaire définitive avec noyaux périphériques. Sarcoplasme périnucléaire et le sarcolemme.

10: Tissu ventriculaire dense mais encore transparent. Grande richesse en fibres.

11: Oreillette différenciée définitivement, structure en travée avec lacunes sanguines.

PLANCHE III

12 et 13: L'épithélium superficiel d'un jeune stade (45 somites) et d'un stade embryonné montrant la différenciation du type pavimenteux.

Longueur de l'échelle: 10 μ.
